



Universidade Norte do Paraná

MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO LEITE DO LEITE
UNIDADE PIZA

SANDRA PRESTES LESSA FERNANDES DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DA APLICAÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL DE
ORÉGANO EM FILME DE PROTEÍNA DE SORO DO LEITE**

Londrina
2013

AVALIAÇÃO DA APLICAÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL DE ORÉGANO EM FILME DE PROTEÍNA DE SORO DO LEITE

Dissertação apresentada à UNOPAR, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia do Leite.

Orientação: Profa. Dra. Priscila C. B. Vianna

Co-orientação: Profa. Dra. Larissa Canhadas Bertan

Londrina
2013

SANDRA PRESTES LESSA FERNANDES DE OLIVEIRA

AVALIAÇÃO DA APLICAÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL DE ORÉGANO EM FILME DE PROTEÍNA DE SORO DO LEITE

Dissertação apresentada à UNOPAR, no Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (Unidade Piza), como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia do Leite, com nota final igual a _____, conferida pela Banca Examinadora formada pelos professores:

Profa. Dra. Priscila C. B. Vianna
UNOPAR

Profa. Dra. Christiane M. V. B. De Rensis
UNOPAR

Profa. Dra. Mayka R. Pedrão
UTFPR - Londrina

DEDICO

Primeiramente a DEUS que manifestou o milagre da vida em mim e me deitou no berço da família Prestes Lessa. Presenteou-me como pais João Lessa Filho "*in memoriam*" e Alexandrina Freire Prestes Lessa. Marília e Marcos como irmãos e companheiros de jornada. Para rolar as pedras da vida e aprender a amar uniu-me a Wilson Roberto Fernandes de Oliveira e abençoou uma nova família. Para que a vida tivesse um sentido maior me presenteou com três amores divinos e infinitos, Tiago, Daniel e Viviane e me proporcionou esse caminho para enriquecer meus conhecimentos.

AGRADECIMENTOS

À Deus pela vida e por me acompanhar em todos os momentos me dando força e coragem para superar todos os desafios e obstáculos .

Ao meu marido Wilson Roberto Fernandes de Oliveira pelo amor, incentivo, compreensão e paciência com a minha ausência.

Aos meus filhos Tiago e Viviane pelo amor, paciência e companheirismo nos momentos mais críticos e tensos e que não me deixaram desistir quando as forças já estavam se esgotando.

Ao meu filho Daniel, "*in memoriam*", pelas palavras ditas há anos atrás "vai fazer mestrado, mãe, claro que você consegue" que guardarei para sempre no coração. Esse título é seu também, meu amado.

Às doutoras Priscila Vianna e Larissa Bertan, orientadora e co-orientadora, que incentivaram e contribuíram para formação profissional e pessoal estando disponíveis e atenciosas para esclarecimentos e incentivo.

À Dra. Christiane Maciel Vasconcellos Barros De Rensis, pelo sorriso, amizade e apoio.

Aos professores do programa do mestrado que transmitiram tantos conteúdos e novos conhecimentos colaborando para meu enriquecimento cultural.

À minha mãe Alexandrina Prestes Lessa, pela força, orações e compreensão pela minha ausência durante esse tempo.

Ao meu pai "*in memoriam*" pelo exemplo de vida e senso de responsabilidade e dever.

À minha irmã Marília Lessa Mortari, pelo apoio e palavras: não desista não! Você vai conseguir! Vai dar tudo certo! Confia em DEUS, principalmente nos momentos de exaustão.

Ao meu irmão Marcos Prestes Lessa pelas palavras: vai firme maninha, confio no teu taco.

A toda minha família que de alguma maneira contribuíram e incentivaram para a realização deste trabalho

À minha secretária e amiga Helena Arévalo que assumiu a administração da minha casa para que eu pudesse ter mais tranquilidade com a fase experimental.

Ao casal amigo Nídia e Nilo Lamy pelo incentivo e força.

Aos colegas do mestrado pela amizade e colaboração durante o curso.

Ao amigo, técnico e colaborador Jorge Donato pelas palavras de estímulo e pelo apoio técnico.

À amiga e terapeuta, Norma Mignone Maia, que sempre me incentivou e acreditou no meu potencial.

OLIVEIRA, Sandra Prestes Lessa Fernandes. **Avaliação da Aplicação de Óleo Essencial de Orégano em Filme de Proteína de Soro do Leite**, 2013, 54 fls. Dissertação - Mestrado em Ciência e Tecnologia do Leite, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, UNOPAR, Londrina, 2013.

RESUMO

A necessidade de redução dos resíduos sólidos plásticos e não degradáveis como agentes de impacto ambiental, gerou interesse em pesquisas com foco em polímeros biodegradáveis como perspectiva de embalagens sustentáveis. As proteínas do soro do leite têm sido aplicadas para a produção de filmes com propostas variadas como embalagens ativas, antimicrobianas, aromáticas e outras. O objetivo dessa pesquisa foi a elaboração de filmes a partir de proteína do soro do leite com incorporação de óleo essencial de orégano em diferentes concentrações e avaliação das propriedades características e da atividade antimicrobiana dos mesmos. Os filmes foram produzidos pela técnica de *casting* a partir de isolado proteico de soro de leite e adicionados de óleo essencial de orégano em 4 concentrações: 0% (filme padrão), 0,5%, 1,0% e 1,5% (v/v). Os filmes foram avaliados quanto ao aspecto visual, resistência à tração, espessura, solubilidade em água, permeabilidade ao vapor de água e atividade antimicrobiana contra o fungo *Penicillium commune*. Os resultados foram avaliados por análise de variância e teste de médias de Tukey a 5% de significância. De modo geral os filmes apresentaram-se transparentes e homogêneos, com uma coloração levemente amarelada. Os filmes mostraram-se mais maleáveis com o aumento da concentração de óleo essencial de orégano. A espessura dos filmes variou de 0,013 mm a 0,015 mm, sendo o filme controle significativamente mais fino que os filmes adicionados de 0,5 e 1,0% de óleo de orégano. A permeabilidade ao vapor de água foi maior nos filmes adicionados de óleo essencial de orégano, provavelmente devido ao óleo de orégano não conseguir se ligar quimicamente à matriz do filme. A solubilidade diminuiu com o aumento da concentração de óleo essencial, sendo que o filme controle e adicionado de 1,0% de óleo de orégano foram mais solúveis que o adicionado de 1,5%. A adição de óleo de orégano melhorou a resistência dos filmes e o filme com adição de 1% de óleo essencial teve resistência maior do que os demais. A atividade antimicrobiana foi avaliada pela medida do halo de inibição formado, que variou de 0 a 1,65 cm. Foi observado um aumento significativo do diâmetro do halo com o aumento da concentração de óleo de orégano. Os filmes adicionados de 1,0% e 1,5% de óleo de orégano apresentaram halos maiores que os filmes padrão e com 0,5% de óleo. Não foi observada diferença significativa entre o diâmetro dos halos dos filmes com 1,0 e 1,5% de óleo de orégano. Os resultados mostraram que os filmes a base de proteína de soro de leite, incorporados com óleo essencial de orégano tem potencial de aplicação como embalagens ativas na área de alimentos e podem prolongar da vida de prateleira dos produtos.

Palavras chaves: Filmes ativos, proteínas do soro, antimicrobianos naturais

OLIVEIRA, Sandra Prestes Lessa Fernandes. **Assessment of Application of Essential Oregano Oil in Whey Protein Films**, 2013, 54 fls. Dissertação - Mestrado em Ciência e Tecnologia do Leite, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, UNOPAR, Londrina, 2013.

ABSTRACT

The need to reduce solid waste and non-degradable plastics as agents of environmental impact generated interest in research focusing on biodegradable polymers as prospect of sustainable packaging. The whey proteins have been applied for the production of films with varying proposed as active packaging, antimicrobial, aromatics and others. The objective of this research was the production of films from whey proteins incorporating oregano essential oil at different concentrations and assessment of the characteristic properties and antimicrobial activity of the films. The films were produced by casting technique from whey protein isolate and added oregano essential oil in 4 concentrations: 0% (standard film), 0.5%, 1.0% and 1.5% (v/v). The films were evaluated for visual appearance, tensile strength, thickness, water solubility, permeability to water vapor and antimicrobial activity against the *Penicillium commune*. The results were evaluated by analysis of variance and Tukey's test at 5% significance. In general, films showed transparent and homogeneous, with a slightly yellowish color. The films were more flexible with increasing concentration of the essential oil. Thickness ranged from 0.013 mm to 0.015 mm, and the control film was significantly thinner than the films made with 0.5 and 1.0% of oregano oil. The water vapor permeability was higher in the oregano essential oil added films, probably due to the oregano oil can't bind chemically to the film matrix. The solubility decreased with increase in the concentration of essential oil, and the control and 1.0% of oregano oil film were more soluble than 1.5%. The addition of oregano oil improved the resistance of the film and the film with 1% of essential oil had significantly higher resistance than the others. The antimicrobial activity was evaluated by measuring the inhibition zone, which ranged from 0 to 1.65 cm. Was observed a significant increase in the diameter of the halo with increasing concentration of oregano oil. Films added with 1.0% and 1.5% of oregano oil showed halos significantly larger than control and 0.5% films. There was no significant difference between the diameter of the halos of the films with 1.0 and 1.5% of oregano oil. The results showed that the films based on whey protein, incorporated with the essential oregano oil has potential application as active packaging in the food and may extend the shelf life of the products.

Key-words: Active films, whey protein, natural antimicrobials

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Filmes produzidos	35
Figura 2 - Colônias de <i>Penicillium commune</i>	Erro! Indicador não definido.
Figura 3 - Teste de difusão em halo para os filmes de proteína de soro do leite adicionados de diferentes concentrações de óleo essencial de oréganos (OEO) frente ao <i>Penicillium commune</i>	Erro! Indicador não definido.2

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores médios de espessura, permeabilidade ao vapor de água e solubilidade dos filmes de proteína de soro do leite.....	36
Tabela 2 - Resistência máxima à tração dos filmes de proteína de soro do leite.....	39
Tabela 3 - Perfil microbiológico da eficiência dos filmes ativos pelo teste de difusão em halo para <i>Penicillium commune</i>	Erro! Indicador não definido. 1

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVO GERAL	17
2.1	Objetivo Geral.....	17
2.2	Objetivos Especificos:.....	17
3	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	18
3.1	Filmes e Coberturas Biodegradáveis.....	18
3.2	Filmes à Base De Hidrocolóides.....	21
3.3	Filmes de Proteínas do Leite	22
3.3.1	Filmes à base de proteína do soro do leite	23
3.4	Aplicação de Óleo Essencial de Orégano em Filmes Comestíveis	25
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	29
4.1	Materiais	29
4.2	Produção dos Filmes	29
4.2.1	Filme Padrão.....	29
4.2.2	Filmes Adicionados de Óleo Essencial de Orégano	30
4.3	Metodologia de caracterização dos filmes	30
4.3.1	Aspecto Visual	30
4.3.2	Espessura.....	30
4.3.3	Permeabilidade ao Vapor de Água (PVA).....	31
4.3.4	Solubilidade em Água	32
4.3.5	Propriedades Mecânicas.....	32
4.3.6	Determinação da efetividade antimicrobiana do filme pelo método de difusão em halo	33
4.3.6.1	Preparação do inóculo	33
4.3.6.2	Teste de difusão em halo.....	34
4.4	Análise Estatística	34
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
5.1	CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES	35
5.1.1	Aspecto visual.....	35
5.1.2	Espessura.....	36
5.1.3	Permeabilidade ao Vapor de água (PVA)	36
5.1.4	Solubilidade.....	38

5.1.5	Resistência máxima à tração (RMT)	39
5.2	Teste de difusão em Halo	41
6	CONCLUSÃO	44
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	45

1 INTRODUÇÃO

A poluição ambiental causada pela deposição de materiais de embalagem não renováveis no meio ambiente demanda alternativas para seu controle e/ou eliminação. Assim, surgiu o interesse em desenvolver filmes com características de embalagens biodegradáveis, que não causem danos ao meio ambiente e que adicionalmente possam melhorar a qualidade dos produtos alimentícios.

Um exemplo particularmente promissor inclui embalagens e/ou revestimentos comestíveis, baseados em proteínas de soro do leite. Associando as características de geleificação com plastificantes específicos (p.ex. sorbitol ou glicerol), é possível desenvolver filmes com permeabilidades diversificadas e, conseqüentemente, adaptadas a diferentes aplicações alimentares. A aplicação destes filmes pode ainda ser melhorada através da adição de agentes antimicrobianos que asseguram uma conservação mais eficaz dos alimentos embalados (ou revestidos); exemplos incluem a adição de antimicrobianos naturais, como as bacteriocinas, ácidos orgânicos, óleos essenciais e quitosanas (FERNANDES et al., 2006). Desta forma, aplica-se a estas embalagens o conceito de embalagens ativas, as quais não somente separam o alimento do ambiente, mas também interagem com o produto acondicionado para modificar propriedades desejáveis, aumentar a vida de prateleira, melhorar a segurança ou propriedades sensoriais, mantendo a qualidade do alimento .

Segundo estudos epidemiológicos foi calculado que em países industrializados 30% das pessoas sofrem de alguma doença veiculada pelos alimentos a cada ano. Assim, existe uma demanda por novos métodos para reduzir ou eliminar microrganismos indesejáveis presentes nos alimentos, possivelmente em combinação com outros já existentes, aplicando o princípio da tecnologia de barreira (FRIEDMAN; HENIKA; MANDREL, 2002; ROJAS-GRAU et al., 2006). Ao mesmo tempo, a sociedade está experimentando tendência ao consumo de produtos mais saudáveis, desejando menos quantidade de aditivos sintéticos nos alimentos e com impacto maléfico menor, na saúde do consumidor. A legislação de alimentos tem restringido progressivamente o uso de alguns conservantes químicos utilizados atualmente, de modo que tal restrição tem criado problemas para a indústria devido ao decréscimo da susceptibilidade de alguns micro-organismos frente a certos

antimicrobianos sintéticos clássicos Conciliando o desejo de produtos mais práticos, e mais saudáveis que geralmente necessitam de agentes conservantes para prolongar sua vida de prateleira, uma opção encontrada é o uso de óleos essenciais de especiarias; compostos relacionados com propriedades antimicrobianas e antioxidantes (SEYDIM; SARIKUS, 2006).

Os óleos essenciais são líquidos oleosos voláteis dotados de aroma forte e quase sempre agradável, provenientes do metabolismo secundário, existentes em quase duas mil espécies vegetais, e distribuídas em sessenta famílias. São normalmente elaborados nas folhas, armazenados em espaços extracelulares, entre a cutícula e a parede celular, e constituídos basicamente pelos terpenos, sintetizados pela rota do ácido mevalônico (FERRI, 1995).

Atualmente dentre os óleos essenciais mais pesquisados com aplicação em alimentos destacam-se os extraídos do orégano. A subespécie *Origanum vulgare* é a mais estudada, quanto à ação terapêutica e aplicação em alimentos. Conhecida popularmente por orégano é uma erva perene e aromática na forma de arbusto, amplamente utilizada na culinária e seu óleo essencial tem sido estudado quanto à atividade antioxidante e antimicrobiana para que possa ser utilizada para inibir ou retardar o crescimento microbiano de patogênicos e/ou deteriorantes (DORMAN; DEANS, 2000; BAYDAR et al., 2004; MANOHAR et al., 2001; SOUZA; STAMFORD; LIMA, 2006; BUSATTA, 2006).

O óleo essencial de *O. vulgare* possui alto conteúdo de compostos fenólicos responsáveis pela sua atividade antimicrobiana e antioxidante. Dentre os componentes, duas substâncias se destacam como princípio ativo, o carvacrol e o timol. Possui ainda, flavonóides, ácido rosmarínico, triterpenos (e.g. ácido oleanóico, ursólico, 4-terpineol, g-terpineno), esteróis, vitamina A, vitamina C, cálcio, magnésio, zinco, ferro, potássio, cobre, boro e manganês (SIVROPOULOU et al., 1996). Segundo Seydim e Sarikus (2006), filmes à base de proteínas do soro do leite incorporados com óleo essencial de orégano são eficientes contra *Escherichia coli* O 157:H7, *Staphylococcus aureus*, *Samonela enteritidis*, *Listeria monocytogenes* e *Lactobacillus plantarum*.

As embalagens ativas e antimicrobianas têm sido utilizadas em uma variedade de produtos, como pães, biscoitos, bolos, pizzas, massas frescas, produtos lácteos e derivados, queijos, carnes, frutas, castanhas, chocolates entre outros (VERMEIREN et al., 1999). Desta forma, os filmes de proteína de soro do

leite adicionados de óleos essenciais com características antimicrobianas podem ser utilizados como uma tecnologia de embalagem ativa aplicada a produtos lácteos como queijos processados e fatiados, com o objetivo de inibir o desenvolvimento de microrganismos patogênicos e deteriorantes e paralelamente aumentar a vida de prateleira destes produtos.

2 OBJETIVO GERAL

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi produzir e avaliar filmes à base de proteína do soro do leite, adicionados de diferentes concentrações de óleo essencial de orégano.

2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS:

Produzir e caracterizar filmes à base de proteínas de soro do leite com diferentes concentrações de óleo essencial de orégano,

Avaliar as propriedades mecânicas dos filmes produzidos

Avaliar a atividade antimicrobiana de cada filme frente ao *Penicillium commune*.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 FILMES E COBERTURAS BIODEGRADÁVEIS

A palavra embalagem está relacionada com invólucro, embrulho, recipiente, acondicionamento ou pacote, tendo assumido ao longo dos séculos uma série de significados próprios, de acordo com a evolução e as necessidades do ser humano. As origens da embalagem remontam há mais de 10 mil anos, sendo que as primeiras embalagens utilizadas foram os troncos de árvores, as conchas, os crânios de animais, as folhas de árvores ou os tecidos. A necessidade de acondicionar surgiu, quando as tribos migravam e precisavam transportar consigo alimentos e água. Cestos fabricados com raízes, pequenos galhos e caules ou até vasos cerâmicos foram outros antepassados das atuais embalagens (KROCHTA; DE MULDER JOHNSTON, 1997).

Mais tarde, os descobrimentos e as novas rotas marítimas impulsionaram o desenvolvimento de embalagens mais resistentes e com maior capacidade de conservação dos alimentos. Em 1815, o Governo francês, sob o comando de Napoleão Bonaparte, ofereceu um prêmio a quem desenvolvesse uma forma de manter os alimentos frescos durante as viagens, com o objetivo de alimentar os seus exércitos. Foi nessa época que surgiram as indústrias de processamento de alimentos e as latas descartáveis. A Revolução Industrial foi outro marco histórico que levou ao desenvolvimento de formatos mais convenientes de embalagens – e que permitissem, paralelamente, manter as características intrínsecas dos produtos. Também a Primeira Guerra Mundial originou uma série de transformações que, mais tarde, se refletiram nos mais diversos setores. Nesta época teve origem a embalagem individual, hoje designada de embalagem de consumo (KIM; USTUNOL, 2001). A mudança de hábitos alimentares assistida ao longo dos anos levou a necessidade de proteger os alimentos (principalmente os alimentos processados), levando à criação de embalagens próprias para este fim. Assim, a embalagem deve preservar as características físicas, organolépticas nutricionais e sanitárias dos alimentos durante o período de estocagem, transporte e comercialização (THARANATHAN, 2003).

O primeiro plástico foi introduzido em 1856; posteriormente, em

1907, foi descoberto um novo plástico que resultou da junção entre o fenol e o formaldeído (BAQUELITE) (KESTER; FENENEMA, 1986). Seguiram então, várias descobertas e invenções, as quais deram origem a uma grande variedade de embalagens produzidas através de polímeros sintéticos. Estes polímeros constituem excelentes barreiras para os compostos aromáticos, gases e vapor de água (MILLER; KROCHTA, 1997). No entanto, não são biodegradáveis, o que leva à intensificação da poluição do ambiente e, conseqüentemente, originam problemas a nível ecológico (THARANATHAN, 2003). Este tipo de embalagem tem sido alvo de atenção por parte da sociedade, uma vez que constitui cerca de 30% dos resíduos sólidos municipais (KROCHTA; MULDER-JOHNSON, 1997). Assim, atualmente a indústria alimentar tem dado maior ênfase às embalagens constituídas essencialmente por biopolímeros, entre os quais, filmes de biopolímeros biodegradáveis e comestíveis (MILLER; KROCHTA 1997).

Na última década tem havido considerável interesse no desenvolvimento de filmes comestíveis para aplicação na indústria de alimentos, como substituto aos filmes plásticos tradicionais. Os filmes comestíveis são películas de variadas espessuras constituídas por diferentes substâncias naturais e/ou sintéticas que isolam o alimento, sem riscos à saúde do consumidor, uma vez que não são metabolizados pelo organismo e sua passagem pelo trato gastrointestinal se faz de maneira inócua (McHUGH; SENESI, 2000).

Pesquisas envolvendo embalagens comestíveis e biodegradáveis tem merecido atenção dos pesquisadores durante as últimas décadas, que vêm estudando novos materiais provenientes de fontes renováveis como alternativa às embalagens plásticas sintéticas (THARANATHAN, 2003). O desenvolvimento de filmes comestíveis para o acondicionamento de alimentos exige o conhecimento das propriedades de barreira dos mesmos. Deste modo, é necessário considerar a permeabilidade dos filmes ao vapor de água, aromas, solutos e lipídeos. Deve-se ainda salientar que a adição de agentes plastificantes aos polímeros provoca alterações nas propriedades mecânicas e de barreira dos filmes (ROBERTSON, 2006).

A elaboração de filmes envolve diversos componentes, cada qual com finalidade específica. Essas formulações são constituídas de, pelo menos, um agente formador de filme, a matriz polimérica (polissacarídeos, proteína, lipídeos), solvente (água, etanol, água/etanol, etc.), plastificante (glicerol, sorbitol, etc.), agente

ajustador do pH (hidróxido de sódio, ácido clorídrico, etc) e aditivos (aromas, vitaminas, antimicrobianos, etc) (GUILBERT, 1986).

Filmes e coberturas proteicas podem atuar como barreira semipermeável à umidade, gases e compostos aromáticos, controlando a transferência de massa (umidade, oxigênio, dióxido de carbono e lipídeos) em sistemas alimentícios, mantendo a integridade estrutural e características de manuseio, retendo compostos aromáticos voláteis e servindo de veículos para aditivos (HERSHKO; NUSSINOVITCH, 1998). Os filmes proteicos podem ser utilizados como um complemento à embalagem sintética, prolongando a vida-de-prateleira garantindo maior qualidade do produto final, além de apresentar um potencial econômico, pois sua matéria-prima é de baixo custo e biodegradável (McHUGH; SENESI, 2000; MATÉ; KROCHTA, 1998; BOTREL, 2007).

O soro de leite é um subproduto da indústria de queijo, possui alto valor funcional e nutritivo e, devidamente processado, seja como concentrado ou isolado proteico, constitui-se num excelente ingrediente para a fabricação de vários alimentos industrializados. Esse sub-produto foi visto como resíduo, sem qualquer valor comercial, e descarregado em cursos de água causando um grave problema ambiental (MORR; HA, 1993; KIM; USTUNOL, 2001) ou, ainda, incorporado em rações para animais. Essa abordagem, porém, foi descartada, devido às excelentes propriedades nutricionais e funcionais do soro, e a elaboração de filmes protéicos de soro de leite, vem sendo estudado para a aplicação como embalagem alternativa (TORRES, 2005; YOSHIDA, 2002). Kim e Ustunol (2001) obtiveram bons resultados com filmes à base de isolado proteico de soro de leite, ressaltando a formação de filmes transparentes, o que favorece sua aplicação em revestimentos para goiabas. A aplicação de filmes e coberturas em alimentos frescos ou minimamente processados reduz o escurecimento, a mudança de cor, a perda de aroma, umidade e textura, pois promove uma barreira a gases e vapor d'água, diminuindo as taxas de metabolismo e oxidação. O metabolismo de alimentos minimamente processados continua ativo, levando a perecibilidade causada pela ruptura celular, aumentando a respiração. Em consequência, essas reações provocam a mudança de cor, textura, aroma, desenvolvimento microbiano e produção de etileno (LI; BARTH, 1998). Segundo Muratore et al. (2005), filmes com permeabilidade adequada podem ser usados para prevenir a contaminação microbiana em alimentos frescos.

3.2 FILMES À BASE DE HIDROCOLÓIDES

Embalagens hidrocoloidais são aquelas formadas a partir de polissacarídeos (amidos, gomas, etc.) ou proteínas (gelatina, glúten, colágeno, etc.). Os filmes à base de hidrocolóides podem ser utilizados onde o controle de difusão de vapor de água não é o objetivo. Eles possuem boas propriedades de barreira ao oxigênio, dióxido de carbono e lipídeos. A maioria também possui propriedades mecânicas desejáveis, tornando-os úteis para melhorar a integridade estrutural de produtos frágeis. A solubilidade em água de filmes de polissacarídeos é extremamente vantajosa em situações onde o filme será consumido junto com o produto que é previamente aquecido para o consumo, pois durante o aquecimento, a embalagem de hidrocoloide seria dissolvida, não alterando as propriedades sensoriais do alimento (KROCHTA; BALDWIN; NISPEROS-CARRIEDO, 1994).

Os hidrocoloides utilizados no preparo de embalagens são classificados de acordo com sua composição, carga molecular e solubilidade em água. Em termos de composição, podem ser tanto carboidratos como proteínas. Filmes à base de carboidratos incluem amido, gomas vegetais (por exemplo, alginatos, pectinas, carragenina, gelana, pululana, e goma arábica) e amidos quimicamente modificados. Filmes à base de proteínas incluem gelatina, caseína, proteína de soja, proteína do soro do leite, glúten de trigo e glúten de farinha de milho. No entanto, existem grandes diferenças no quão facilmente os filmes de boa integridade podem ser formados por essas substâncias (FANG et al., 2002, KROCHTA; BALDWIN; NISPEROS-CARRIEDO, 1994).

O estado carregado de um hidrocolóide pode ser útil para formação de um filme. Alginatos e pectinas requerem a adição de um íon polivalente, geralmente o cálcio, para facilitar a formação do filme. Assim como as proteínas, são susceptíveis às mudanças do pH por causa do seu estado carregado. Para algumas aplicações uma vantagem pode ser alcançada combinando hidrocolóides de cargas opostas como a gelatina e a goma arábica (KROCHTA; BALDWIN; NISPEROS-CARRIEDO, 1994). Revestimentos comestíveis com gelatina reduzem a difusão de oxigênio, umidade e óleo ou podem carrear agentes antioxidantes ou antimicrobianos (KROCHTA; DE MULDER JOHNSTON, 1997).

Worrell et al. (2002) relata que embora os filmes de hidrocolóides possuam baixa resistência a vapor d'água por causa de sua natureza hidrofílica, os

que são apenas moderadamente solúveis em água, como no caso da etil-celulose, do glúten de trigo e do glúten da farinha de milho proveem uma resistência relativamente maior à passagem de vapor d'água comparado a resistência que os hidrocolóides solúveis em água fornecem.

3.3 FILMES DE PROTEÍNAS DO LEITE

Proteínas do leite tem se mostrado excelentes materiais para formação de filmes comestíveis por causa do alto valor nutritivo e das numerosas propriedades funcionais as quais são importantes para a formação dos filmes (McHUGH; KROCHTA, 1994; ARVANITTOYANNIS; PSUMIADOU; NAKAYAMA, 1996; CHEN, 2002; PÉREZ-GAGO; KROCHTA, 2001). Os filmes protéicos vêm sendo empregados há muito tempo para conservação dos alimentos (DONHOWE; FENNEMA, 1994).

As proteínas devem apresentar-se na forma aberta para permitir a interação molecular, necessária para a formação do filme. A extensão desta interação depende da estrutura da proteína (grau de extensão da cadeia) e da sequência dos resíduos de aminoácidos hidrofóbicos e hidrofílicos da proteína. O aumento da interação molecular da cadeia de proteína resulta em filmes fortes, porém, menos flexíveis e permeáveis. O grau de hidrofilicidade do resíduo de aminoácido da proteína controla a influência da umidade na propriedade de transporte de massa do filme, tornando filmes de proteína em excelente barreira para substâncias não polares, tal como o oxigênio (KROCHTA; MULDER-JOHNSTON, 1997).

Filmes produzidos a partir de proteínas do leite têm propriedades mecânicas boas e agem como excelentes barreiras para lipídeos, oxigênio e aromas. Entretanto, eles não fazem barreira à umidade, devido a sua natureza hidrofílica (KHWALDIA et al., 2004; SEYDIM; SARIKUS, 2006; GOUNGA; XU; WANG, 2007). Quando processadas adequadamente, as proteínas do soro de leite produzem filmes flexíveis, transparentes e sem odores (GENNADIOS et al., 1994).

Filmes de caseína são preferidos para aplicação em alimentos pelo alto valor nutritivo, características sensoriais e com capacidade de proteger produtos alimentícios da contaminação por micro-organismos patógenos (CHEN, 2002; SCHOU et al., 2004).

3.3.1 Filmes à base de proteína do soro do leite

O soro de leite foi visto como resíduo, sem qualquer valor comercial, e descarregado em cursos de água ou, ainda, incorporado em rações para animais. Essa abordagem, porém, foi descartada, pois devido às excelentes propriedades nutricionais e funcionais do soro, a formação de filmes proteicos de soro de leite vem sendo estudado para a aplicação como embalagem alternativa (TORRES, 2005; YOSHIDA, 2002).

O soro do leite é a fração aquosa liberada do coágulo durante a fabricação convencional de queijos (FARREL et al., 2004). A fabricação do queijo é um processo de concentração do leite por um fator de seis a 12 vezes dependendo da variedade (FOX; McSWEENEY, 1998). Considerado como um efluente residual pode acarretar graves problemas ambientais associados ao seu alto teor de matéria orgânica. O seu reaproveitamento tem sido estudado e sugerido para melhorar a eficiência econômica dos laticínios minimizando os impactos ambientais (MIZUBUTI, 1994; BIEGER; RINALDI, 2009). Cerca de 90 a 95% do volume do leite usado para a fabricação de queijos resultam em soro, o qual contém, aproximadamente, metade dos sólidos totais do leite, incluindo proteínas solúveis, sais e principalmente lactose (PACHECO et al., 2005; CHAVES et al., 2010).

A fração proteica do soro do leite é muito heterogênea, constituída essencialmente, por β -lactoglobulina, α -lactalbumina, albumina sérica, imunoglobulinas, derivados de α -caseína (proteose peptonas) e ainda, em menor quantidade, lactoperoxidase, lactotransferrina e outras enzimas. A β -lactoglobulina na forma monomérica contém duas ligações dissulfeto intramoleculares e um grupo tiol livre (-SH). A α -lactalbumina monomérica é uma metaloproteína (liga ao cálcio), a qual possui quatro ligações dissulfeto intramoleculares. As proteínas que constituem o soro do leite, contrariamente às caseínas, são menos resistentes termicamente, sofrendo a desnaturação a uma temperatura próxima de 70°C (PÉREZ-GAGO; KROCHTA, 2002). A fração proteica do soro contém, aproximadamente, 50% de β -lactoglobulina, 25% de α -lactoalbumina e 25% de outras frações protéicas, incluindo imunoglobulinas (FITZSIMONS et al., 2006). Sob o ponto de vista nutricional, o soro do leite é considerado levemente superior comparado à caseína, além de ter alto conteúdo dos aminoácidos essenciais, especialmente lisina, treonina, triptofano, fenilalanina e tirosina e a presença da proteína superior lactalbumina (SEVERO,

1995; LIU et al., 2000).

A utilização de proteínas do soro do leite com a adição de plastificante e desnaturação da solução filmógena, obtem-se filmes transparentes, brandos e flexíveis com excelentes propriedades de barreira para o oxigênio, aromas e lípidos, em baixos valores de umidade relativa (MILLER; KROCHTA, 1997). Quando a formulação dos filmes sofre desnaturação da solução de proteína, estes filmes tornam-se insolúveis em água e se apresentam com propriedades mecânicas melhores, fato que pode contribuir para a melhoria da manutenção da integridade dos alimentos. No entanto, a natureza hidrofílica dos filmes de proteína do soro do leite é responsável pela baixa eficácia como barreira para o vapor de água. Esta propriedade pode ser melhorada com a incorporação de lipídeos (PÉREZ-GAGO; KROCHTA, 2002).

Min e Krochta (2008) desenvolveram uma película de recobrimento à base de proteína do soro contendo ácido ascórbico para controle da oxidação em amendoim. Os resultados demonstraram que o recobrimento retardou significativamente a oxidação lipídica em amendoins. Alleoni e Antunes (2004) observaram uma menor perda de massa em ovos recobertos com filmes elaborados a partir de concentrado protéico de soro do leite.

Filmes de concentrado de proteínas de soro do leite quando armazenados em locais com alto teor de umidade apresentam alta permeabilidade ao oxigênio (CISNEROS-ZEVALLOS; KROCHTA, 2003). A permeabilidade ao vapor d'água deste tipo de filme está mais relacionada com as quantidades de glicerol e com a concentração de íon de cálcio do que com a concentração de proteínas (FANG et al., 2002). Apresentam-se quebradiços quando produzidos com baixo teor de plastificantes (TALENS; KROCHTA, 2005).

Filmes produzidos exclusivamente de concentrados ou isolados de proteínas do soro do leite, mostram-se quebradiços, tornando inviável a utilização para produção de embalagens ou coberturas. Assim, faz-se necessário incorporar plastificantes às matrizes poliméricas para resolver a questão da rigidez desses filmes e conseqüentemente melhorar suas propriedades mecânicas (GONTARD; GUILBERT; CUQ, 1993; MALI; SHIMAZU; GROSSMANN, 2007). Entre os plastificantes utilizados em biofilmes, podem ser encontrados mono-, di- e oligossacarídeos (glicose e sacarose), polióis (glicerol, sorbitol, derivados da glicerina e gliceróis), lipídeos (ácidos graxos saturados, monoglicerídeos e derivados

de éster, fosfolipídios e surfactantes) e triacetina (GUILBERT, 1986; FAKHOURI; BATISTA; GROSSO, 2003; BERTAN et al., 2003). Hoje, o mercado oferece numerosas opções de plastificantes, mas a escolha deve ser de acordo com as características e compatibilidade com o polímero utilizado. Além da compatibilidade o plastificante deve ser estável em ambientes de temperaturas altas e baixas, manter lubrificação em ampla faixa de temperatura, ser insensível a radiação ultra violeta solar, ter custo baixo e cumprir os regulamentos de saúde e segurança (RHAMN; BRAZEL, 2004).

3.4 APLICAÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL DE ORÉGANO EM FILMES COMESTÍVEIS

Coberturas e filmes comestíveis não pretendem, e nem sempre têm a capacidade para, substituir uma embalagem sintética não comestível com o intuito de prolongar a estocagem dos alimentos. Sua utilização está relacionada à capacidade de agir como um adjunto para promover maior qualidade, estendendo a vida de prateleira, e possibilitar a economia com materiais de embalagem. A função a ser desempenhada pelo filme depende do produto alimentício e principalmente do tipo de deterioração a que este produto está submetido (KESTER; FENNEMA, 1986).

Embalagens ativas são um tipo de embalagem que não somente separam o alimento do ambiente, mas também interagem com o produto acondicionado para modificar propriedades desejáveis (APPENDINI; HOTCHKISS, 2002; QUINTAVALLA; VICINI, 2002). A adição de substâncias antimicrobianas em filmes e coberturas causa a redução da taxa de crescimento de micro-organismos, permite estender a fase lag do micro-organismo alvo, prolongando a vida de prateleira do produto. A contaminação dos alimentos é maior na superfície do produto, e a embalagem antimicrobiana, pelo contato com o alimento e liberação gradativa dos compostos antimicrobianos, tem função importante na conservação (APPENDINI; HOTCHKISS, 2002).

De acordo com Villadiego et al. (2005), as substâncias antimicrobianas mais utilizadas junto com as embalagens comestíveis são o ácido sórbico, ácido propiônico, sorbato de potássio, ácido benzóico, benzoato de sódio e ácido cítrico. Uma substância natural também utilizada é a lisozima, que inibe

principalmente bactérias gram-positivas. As substâncias antimicrobianas podem ser adicionadas aos polímeros por fusão ou por solubilização do composto dentro da matriz. Devido a muitas serem sensíveis ao calor, o método por solubilização é o mais indicado para incorporá-las na matriz do biopolímero (APPENDINI; HOTCHKISS, 2002).

Além dos antimicrobianos sintéticos, os antimicrobianos naturais, como os óleos essenciais, também podem ser utilizados em filmes. Óleos essenciais são definidos como os produtos obtidos de partes de plantas mediante destilação por arraste com vapor d'água, bem como os produtos obtidos por expressão dos pericarpos de frutos cítricos. Representam misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas (SANTOS, 2004).

Podem ser chamados de óleos voláteis, óleos etéreos ou essências, por serem de aparência oleosa à temperatura ambiente; mas sua principal característica é a volatilidade, diferindo, assim, dos óleos fixos, os quais são misturas de substâncias lipídicas, obtidos geralmente de sementes. Outra característica importante é o aroma intenso da maioria dos óleos essenciais, os quais são solúveis em solventes orgânicos apolares. Seus constituintes variam desde hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas e cumarinas, até compostos com enxofre. Na mistura, tais compostos apresentam-se em diferentes concentrações; normalmente, um deles é o composto majoritário, existindo outros em menores teores e alguns em baixíssimas quantidades (SIMÕES et al., 2004).

O uso de óleos vegetais em embalagens é autorizado no Brasil sem restrições (BRASIL, 2007), mas a baixa concentração dos compostos antimicrobianos nos óleos e extratos torna necessário a incorporação de quantidades maiores para garantir a concentração mínima inibitória (APPENDINI; HOTCHKISS, 2002), podendo alterar características sensoriais do alimento, tornando-se um ponto negativo (COMA, 2008).

Muitas plantas são usadas com fins medicinais por conterem esses compostos voláteis, mas, em muitos casos, o próprio óleo separado da planta é usado como medicamento (ROBBERS, 1997). Quimicamente, a maioria dos óleos essenciais é constituída de derivados fenilpropanóides ou de terpenóides, preponderando esses últimos. Normalmente apresentam um composto majoritário

que lhes conferem a nomenclatura. Entre as espécies aromáticas, o *Origanum vulgare* conhecido popularmente como orégano, apresenta inúmeras atividades biológicas, reflexos da diversidade química que possui. Indústrias farmacêuticas e alimentares são as mais antigas exploradoras dos óleos essenciais dessa planta, por possuírem comprovada atividade antibacteriana e antifúngica. A atividade antimicrobiana do óleo essencial de orégano é atribuída à presença de carvacrol, timol e grande variedade de hidrocarbonetos monoterpênicos e álcoois monoterpênicos (CRAVEIRO, 1981). Rhayour et al. (2003) reportam a ação antimicrobiana do óleo essencial de orégano ao composto timol, isômero do composto carvacrol, e descrevem danos causados à parede celular como o mecanismo de ação desses compostos.

O óleo essencial de *Origanum* spp. é reconhecido como seguro (GRAS) pelo “Food and Drug Administration” (FDA, 2006). Souza et al. (2006) avaliaram a sensibilidade de várias bactérias ao óleo essencial de orégano: *Aeromonas hydrophilla*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella enterica*, *Serratia mercencens*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, e *Yersinia enterocolitica*. Todos os microrganismos testados foram sensíveis à presença do óleo essencial de orégano (20µL/disco), apresentando halos de inibição com variação de 30-36 mm. A concentração mínima de inibição variou entre 20-40µL/mL para a maioria das bactérias, sendo as gram-positivas, de modo geral, as mais sensíveis. Para *L.monocytogenes* e *S. choleraesuis* foram encontradas concentrações mínimas inibitórias, maiores (80µL/mL) (DEVLIEGHERE; VERMEIREN; DEBEVERE, 2004).

Segundo Sahin et al. (2004), foi reportado ao óleo essencial de orégano atividade antimicrobiana contra 10 cepas de bactérias, 15 fungos e espécies de leveduras. Milos et al. (2000) demonstrou que espécies de *Origanum* possuem atividade antimicrobiana e antioxidante e enfatizam que as propriedades biológicas podem variar de acordo com as técnicas de plantio utilizadas, pelo estágio vegetativo e a estação de coleta do material vegetal.

O óleo essencial de orégano vem sendo utilizado em filmes ativos de composição diversa para a aplicação em alimentos. Botre et al. (2010) desenvolveram um filme de base celulósica incorporado de óleo essencial de

orégano para conservação de pizza pronta refrigerada. Entretanto, a concentração de óleo essencial utilizada não foi suficiente para inibir o desenvolvimento microbiano, além de diminuir a resistência mecânica dos filmes.

Pellissari et al. (2009) observaram a inibição de *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis* e *Staphylococcus aureus* em filmes de amido-quitosana adicionados de óleo de orégano. Além disso, a adição do óleo melhorou as propriedades de barreira e levou a formação de filmes mais flexíveis. Filmes à base de isolado proteico de soro (WPI) contendo 2% de óleo de orégano mostraram-se eficientes embalagens ativas para *Escherichia coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis*, *Listeria monocytogenes* e *Lactobacillus plantarum*.

Em outro estudo, Oussalah et al. (2004), produziram filmes à base de proteína do leite contendo óleo de orégano e pimenta para preservação de carne bovina. Os filmes com óleo de orégano estabilizaram a oxidação lipídica nos bifés e mostraram-se efetivos contra cepas de *E. coli* O157:H7 e *Pseudomonas* spp.

Filmes a base de isolado de proteína do soro do leite, incorporados com 1,5% de óleo essencial de orégano (*Origanum vulgares* sp. *Hirtum*) reduziram a contagem total de microrganismos, *Pseudomonas* spp. e bactérias ácido-lácticas em cortes de carne bovina *in natura* durante armazenamento sob refrigeração (5°C) (ZINAVIADOU; KOUTISOUMANIS; BILIADERIS, 2009). Filmes comestíveis a base de proteínas de soro do leite com incorporação de óleo essencial de orégano apresentam maior eficiência contra *Escherichia coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis*, e *Lactobacillus plantarum* do que os óleos essenciais de alecrim e alho (SEYDIM; SARIKUS, 2006).

As propriedades antimicrobianas e físico-químicas de filmes de quitosana enriquecidos com óleos essenciais, entre eles o óleo de orégano, foram avaliadas por Zivanovic et al. (2005). Quando aplicados em mortadelas inoculadas com *L. monocytogenes* e *E. coli*, os filmes de óleo de orégano reduziram a contagem destes microrganismos. Os autores observaram ainda a diminuição da permeabilidade ao vapor de água e da resistência à tração e o aumento da elasticidade destes filmes e confirmam o potencial da utilização destes filmes como embalagens ativas para alimentos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

Os filmes foram produzidos a partir de isolado proteico de soro de leite (WPI Bipro 95%, Davisco, EUA). Glicerol (Synth, Brasil) foi adicionado à formulação com a função de plastificante. O óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare*) foi adquirido da empresa FERQUIMA Indústria e Comércio Ltda (Vargem Grande Paulista, São Paulo, Brasil). O óleo essencial atendeu a todas as especificações exigidas em relação ao seu controle de qualidade conforme laudo de análise fornecida pelo fornecedor

4.2 PRODUÇÃO DOS FILMES

Foram elaborados quatro tipos de filmes: 1) filme padrão composto de Isolado proteico do soro de leite e glicerol; 2) filme de isolado proteico do soro de leite adicionado de óleo essencial de orégano em três diferentes concentrações: 0,5%, 1,0% e 1,5%. As concentrações de óleo essencial foram definidas com base em dados da literatura (SEYDIM; SARIKUS, 2006).

4.2.1 Filme Padrão

Os filmes foram produzidos por *casting* segundo metodologia descrita por Yoshida e Antunes (2009). O isolado protéico de soro (7,0%, em massa seca) foi disperso em água destilada, seguido de homogeneização com agitação em agitador magnético até a solubilidade total. Após a solubilização, foi adicionado 3,0% de glicerol e a solução filmogênica foi aquecida à 90°C/30 minutos em banho-maria, com o objetivo de desnaturar as proteínas. Após resfriamento a temperatura ambiente (25°C) o pH da solução foi ajustado para 7,0 utilizando-se NaOH 0,1N. Padronizou-se um volume de 10ml da solução que foi distribuída em placas de Petri com 9cm de diâmetro, levemente untadas com óleo de girassol. As soluções distribuídas nas placas foram secas por 24 horas a 24°C. Após secagem os filmes foram removidos das placas com o auxílio de uma espátula e armazenados em

dessecadores com URE de 53% (solução saturada de nitrato de magnésio) e separados por folhas de papel de seda.

4.2.2 Filmes Adicionados de Óleo Essencial de Orégano

A metodologia para a produção dos filmes com adição dos antimicrobianos foi a mesma seguida para o filme padrão diferindo apenas pela adição do óleo essencial de orégano nas concentrações de 0,5%, 1,0% e 1,5% às suas respectivas soluções filmogênicas, antes do aquecimento a 90°C/30 minutos, para facilitar sua incorporação à matriz proteica. O processo de secagem e acondicionamento dos filmes foi o mesmo para o filme padrão.

4.3 METODOLOGIA DE CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES

A caracterização dos filmes secos foi realizada após acondicionamento dos filmes em dessecadores com umidade controlada, URE de 53% a 25°C por um período de 48 horas. Os filmes foram caracterizados quanto ao aspecto visual, espessura, propriedades de barreira ao vapor de água, solubilidade em água e propriedades mecânicas.

4.3.1 Aspecto Visual

Os filmes foram avaliados quanto ao aspecto visual e tátil com a finalidade de selecionar apenas os filmes homogêneos (sem a presença de partículas insolúveis, bolhas e coloração uniforme), contínuos, sem rupturas ou zonas quebradiças para as determinações analíticas.

4.3.2 Espessura

A espessura dos filmes foi determinada utilizando-se um micrômetro digital, com resolução de 0,001 mm (MITUTOYO, MDC-25M, Kanagawa, Japan) e foi calculada como sendo a média aritmética de dez medidas sobre a área do filme.

4.3.3 Permeabilidade ao Vapor de Água (PVA)

A Permeabilidade ao Vapor de Água foi determinada gravimetricamente a 25°C segundo método padrão E-96-95 da ASTM (ASTM 1995). O filme foi previamente acondicionado em URE de 53% (solução saturada de nitrato de magnésio) por 48 horas e temperatura de $23 \pm 2^\circ\text{C}$. Os melhores filmes foram selecionados pelo aspecto visual e tátil, recortados em discos com 9 cm de diâmetro e em seguida fixados na abertura circular da cápsula de permeabilidade, de modo a garantir que a migração de umidade ocorresse exclusivamente através do filme. O interior da cápsula foi preenchido com 15 g de cloreto de cálcio e o sistema foi introduzido em dessecador contendo solução saturada de cloreto de sódio correspondente a uma URE maior que a do interior da cápsula, criando um gradiente de URE que force a passagem de vapor de água para o interior da cápsula. O ensaio para cada formulação foi realizado em triplicata com gradiente de URE (0-75%) a 25°C. O vapor de água transferido através do filme foi determinado pelo ganho de massa do cloreto de cálcio, medido a cada 24 horas por 7 dias. A taxa de permeabilidade ao vapor de água (TPVA) foi calculada pela Equação 1:

$$TPVA = \frac{m}{t} \times \frac{1}{A} \quad (1)$$

TPVA = Taxa de Permeabilidade ao vapor

A= é a área de permeação do corpo-de-prova (m^2).

m = massa

t = tempo

A permeabilidade ao vapor de água foi calculada pela equação 2:

$$PVA = \frac{TPVA \times e}{p_s \times (UR_1 - UR_2)} \quad (2)$$

e= é a espessura média do corpo-de-prova (m),

p_s = a pressão de saturação de vapor à temperatura do ensaio (Pa),

$UR_{1=}$ a umidade relativa no interior do dessecador

UR_2 = a umidade relativa no interior da cápsula.

4.3.4 Solubilidade em Água

A solubilidade em água dos filmes foi determinada segundo o método proposto por Gontard et al. (1994) e a análise foi realizada em triplicata. As amostras foram recortadas em discos de 2,5 cm de diâmetro e colocados em estufa a 105°C/24 horas para secagem e obtenção da massa seca inicial. As amostras secas foram imersas em um recipiente contendo 50 mL de água destilada e mantidas sob lenta agitação (100 rpm) por 24 horas a 25°C, utilizando-se uma mesa agitadora automática. Após esse período, as amostras foram submetidas novamente à secagem em estufa a 105°C/24 horas, para a obtenção da massa seca final. A solubilidade foi calculada utilizando a Equação 3:

$$SOL = (M_i - M_f) / M_i \times 100 \quad (3)$$

onde:

SOL = massa solubilizada em função da massa seca inicial (%);

M_i = massa seca inicial (g);

M_f = massa seca final, após solubilização (g).

4.3.5 Propriedades Mecânicas

As propriedades mecânicas de tração foram avaliadas utilizando-se Analisador de Textura TA.XT2 (Stable Micro System, Hasleme, Inglaterra), de acordo com o método da *American Society for Testing and Material* (ASTM D 882-10, 2010). As medidas foram conduzidas a temperatura de 25°C. As amostras foram cortadas em tiras de 80 mm de comprimento x 25 mm de largura e ajustadas às garras do equipamento com distância de 30 mm. Foi determinada a resistência máxima à tração na ruptura (MPa). Para a análise, 10 amostras de cada formulação foram acondicionadas em 53% de URE (solução saturada de nitrato de magnésio) por 48 horas e temperatura de 23±2°C .

A resistência à tração é a máxima tensão suportada pelo filme até o momento de sua ruptura.

A resistência à tração foi calculada segundo a equação 4:

$$RMT = F_m/A \quad (4)$$

onde:

RMT = resistência máxima a tração na ruptura (MPa);

F_m = força máxima no momento da ruptura do filme (N);

A = área da secção transversal do filme (m²);

4.3.6 Determinação da efetividade antimicrobiana do filme pelo método de difusão em halo

4.3.6.1 Preparação do inóculo

É um importante fungo deteriorador de alimentos caracterizado por crescimento vagaroso e produção de conídios verdes ou azuis nascidos em penicilos (Figura 2). Produz colônias turquesa-acinzentada a verde escuras em CYA (Agar extrato de levedura Czapeck) com conidiogênese moderada (TANIWAKI, 2001). A temperatura de 25°C alcançam 2,5 a 3,5cm em 7 dias, produzindo conídios verde-acinzentados. Ocorrem também em colônias amareladas. O ácido ciclopropiónico é o seu principal metabólito tóxico (PITT, 2000; SANSOM et al., 2001; BATISTA, 2003).

Para a determinação da efetividade antimicrobiana dos filmes de isolado proteico de soro de leite foi utilizado cultura liofilizada de *Penicillium commune* (CCT 4685) cedida pela Fundação André Tosello (Campinas, São Paulo, Brasil).

A reativação das células liofilizadas de *Penicillium commune* foi realizada conforme o procedimento: a cultura liofilizada foi reidratada por 30 minutos em água destilada estéril e todo o conteúdo foi vertido sobre uma placa contendo Potato Dextrose Agar . A placa foi incubada a 25°C por 5 dias. Após o crescimento das colônias, alçadas dos microrganismos foram transferidas para tubos contendo ágar PDA, que foram novamente incubados a 25°C por 5 dias e depois mantidos sob temperatura de refrigeração (7°C). Estes tubos foram continham o inóculo que foi utilizado nos testes de difusão em halo.

Para a realização do teste de difusão em halo, foi feita uma

raspagem das colônias do inóculo com auxílio de uma alça, as quais foram transferidas para um frasco contendo 50 mL de água peptonada 0,1% com 0,1% de Tween 80. A suspensão foi agitada por 1 min e filtrada com auxílio de gaze estéril. A partir desse inóculo inicial, foram realizadas diluições decimais e escolhida a suspensão para o teste de difusão de acordo com as características de crescimento do microrganismo teste.

4.3.6.2 Teste de difusão em halo

Os filmes ativos foram colocados na superfície do meio de cultura PDA (Potato Dextrose Ágar) já solidificado e com 0,1 mL de suspensão de *Penicillium commune*, semeada com alça de Drigalski. Cortes circulares dos filmes (adicionados de 0,5%; 1,0% e 1,5% de óleo essencial de orégano) com 2,5 cm de diâmetro foram colocados assepticamente sobre a superfície do meio solidificado e com o microrganismo teste. As placas foram incubadas a 25°C por 5 dias. A eficiência do agente antimicrobiano foi avaliada pela formação de halo ao redor dos filmes (PEREIRA et al., 2006) e pela quantificação da unidade formadora de colônia (UFC/mL). Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Como controle foi utilizado filme sem o agente antimicrobiano

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística de variância (ANOVA) foi realizada utilizando-se o programa Statistica (versão 8.0, 2007; Stat-Soft Inc., Tulsa, OK). As diferenças significativas entre as médias foram identificadas por meio do teste de Tukey ($p < 0,05$).

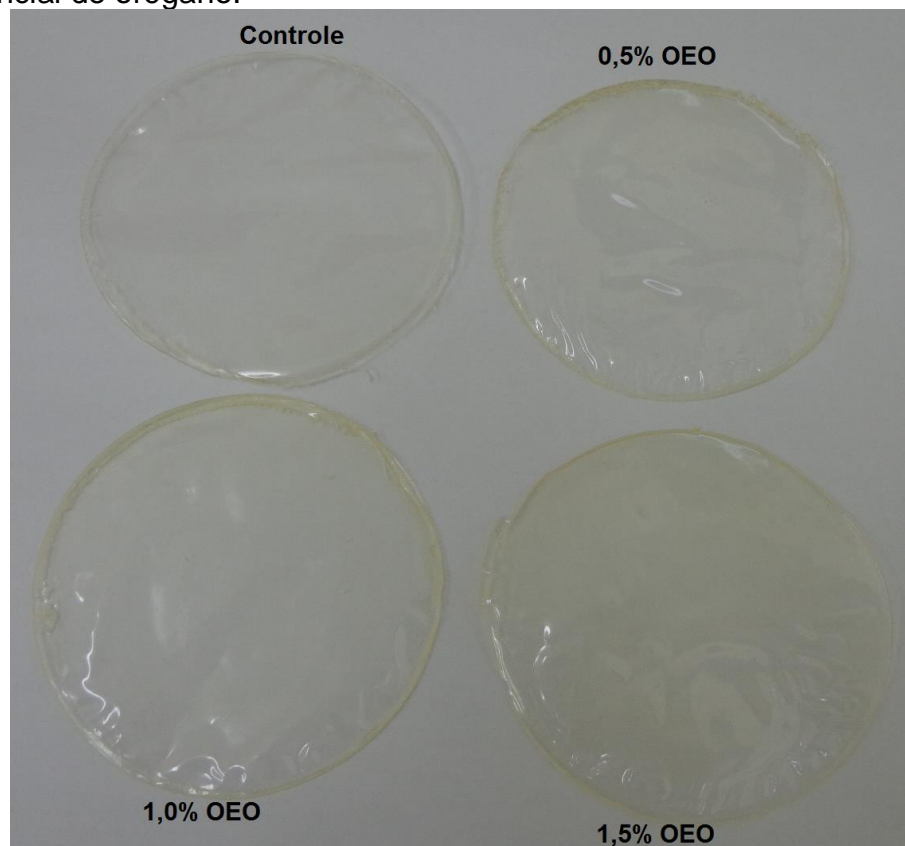
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES

5.1.1 Aspecto visual

Os filmes elaborados com isolado proteico de soro de leite com e sem a adição do óleo essencial de orégano nas diferentes concentrações apresentaram-se, de forma geral, homogêneos e transparentes à análise visual, com uma coloração levemente amarelada Figura 1. Os filmes elaborados com as maiores concentrações de óleo essencial (1,0% e 1,5%) apresentaram-se visualmente mais maleáveis que os demais. Ramos et al. (2013), trabalhando com filmes produzidos a partir de concentrado proteico ou isolado proteico de soro de leite, observaram características visuais semelhantes às encontradas neste trabalho.

Figura 1 – Filmes elaborados com isolado proteico e diferentes concentrações de óleo essencial de orégano.



5.1.2 Espessura

A espessura dos filmes produzidos variou entre 0,013 mm e 0,015 mm (Tabela 1). Não houve variação significativa entre as espessuras dos filmes incorporados de óleo essencial de orégano (OEO), entretanto, o filme controle apresentou espessura inferior aos filmes com 0,5% e 1,0% de óleo essencial. A espessura dos filmes está diretamente ligada ao volume de solução filmogênica colocado nas placas. Apesar de se observar uma diferença significativa entre as espessuras do filme controle comparada com os adicionados de 0,5% e 1,0% de óleo essencial, a variação numérica é muito baixa e provavelmente pode ter sido causada pela imprecisão da proveta no momento da medição dos volumes adicionados às placas. Bertan et al. (2005) observaram que a adição de substâncias hidrofóbicas promoveu aumento na espessura dos biofilmes, sendo necessário utilizar alíquotas diferentes para cada formulação com o objetivo de controlar as espessuras para a repetibilidade das medidas e validade das comparações entre as propriedades analisadas. No caso deste trabalho, pode-se considerar que a porcentagem da substância hidrofóbica (óleo essencial de orégano) foi muito baixa para causar tal variação.

Tabela 1 - Valores médios de espessura, permeabilidade ao vapor de água e solubilidade dos filmes de proteína de soro do leite.

Tratamentos	Espessura (mm)	PVA (g mm/m ² dia kPa)	Solubilidade (%)
Controle	0,01342 ± 0,002 ^b	7,0 x 10 ⁻⁴ ± 6,7 x 10 ^{-5a}	20,2 ± 2 ^a
0,5% OEO ¹	0,01542 ± 0,001 ^a	9,8 x 10 ⁻⁴ ± 3,8 x 10 ^{-4b}	17,1 ± 2 ^{ab}
1% OEO	0,01500 ± 0,001 ^a	1,1 x 10 ⁻³ ± 1,1 x 10 ^{-4b}	17,2 ± 1 ^a
1,5% OEO	0,01475 ± 0,001 ^{ab}	1,0 x 10 ⁻³ ± 6,7 x 10 ^{-5b}	14,0 ± 3 ^b

¹OEO: óleo essencial de orégano. ^{a,b} Médias com letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente entre si (p<0,05).

5.1.3 Permeabilidade ao Vapor de água (PVA)

Os resultados da permeabilidade ao vapor de água dos filmes são apresentados na Tabela 1. Pode-se observar que a PVA foi significativamente maior nos filmes adicionados de óleo essencial de orégano, ao contrário do que se espera para filmes adicionados de substâncias hidrofóbicas. A incorporação de lipídeos na

matriz filmogênica proteica, reduz a afinidade por moléculas de água, reduzindo a permeabilidade ao vapor d'água dos filmes (YOSHIDA; ANTUNES, 2009). Provavelmente, o óleo essencial de orégano não conseguiu se ligar quimicamente à matriz proteica, deixando espaços vazios pelos quais a água poderia permear ocasionando uma maior PVA aos filmes ativos.

Resultados semelhantes foram encontrados por GONTARD et al. (1994) que avaliaram a incorporação de substâncias hidrofóbicas em filmes a base de glúten de trigo. Os autores observaram que as moléculas de substâncias hidrofóbicas que possuem dimensão esférica substancialmente grande, quando utilizadas em formulações de filmes compostos, se esses componentes não forem capazes de se associar com a cadeia de proteína, podem provocar quebra na estrutura da matriz proteica resultando em uma perda global das propriedades de barreira à água. Ao utilizar concentrações elevadas (20% de lipídeos), os autores explicaram que a distribuição dos mesmos na matriz estrutural da proteína pode ter sido prejudicada, possibilitando a formação de zonas com maior concentração do componente apolar, o qual pode ter proporcionado o aparecimento de rachaduras e canais preferenciais, através dos quais a água difundiu-se pela matriz. Porém se a substância hidrofóbica for capaz de se ligar de maneira adequada à matriz proteica, o transporte de água é resistente.

Wong et al (1992) estudaram o efeito da adição de ácidos graxos em filmes de quitosana, os autores observaram que a adição de ácido palmítico provocou um aumento na permeabilidade ao vapor de água dos filmes, o que pode ter sido causado pela heterogeneidade da matriz. Kamper e Fennema (1984, a, b) estudaram o efeito da adição de ácido graxo em filmes de hidroxipropil metil celulose (HPMC). Os autores observaram que o aumento da concentração de ácido esteárico de 0,85 mg para 1,2 mg resultou em um aumento da PVA dos filmes.

Apesar das baixas concentrações de óleo de orégano utilizadas nesse estudo, comparadas aos trabalhos acima citados, o aumento da PVA pode ter sido ocasionado pela incompatibilidade do óleo em se associar ao isolado proteico de soro de leite, resultando em uma desestruturação da matriz do filme. De forma geral os filmes apresentaram-se muito pouco permeáveis ao vapor de água, independente da adição do óleo de orégano. Os valores aqui encontrados foram inferiores aos observados por outros autores. Yoshida e Antunes (2009) encontraram valores médios de PVA de 0,3023 e 0,2680 g mm/h m² kPa para filmes

de proteína de soro do leite padrão e emulsionado com ácido esteárico, respectivamente. Valores de PVA de 15,013 e 13,526 g mm/h m² kPa foram encontrados por Mei e Zhao (2003) para filmes de proteína de soro do leite padrão e adicionado de 0,2% de acetato de α -tocoferol.

5.1.4 Solubilidade

Os resultados para a avaliação da solubilidade podem ser observados na Tabela 1. Os filmes controle e adicionado de 1% de óleo essencial apresentaram solubilidade significativamente maior que o filme adicionado de 1,5% de óleo. Não foram observadas diferenças entre os demais filmes. A menor solubilidade do filme com 1,5% de óleo essencial pode ser explicada pelo seu maior caráter hidrofóbico.

Todos os filmes mantiveram-se íntegros após o teste de solubilidade, indicando a formação de uma rede com alta estabilidade. McHugh e Krochta (1994d); Fairley et al. (1996) e Galietta et al. (1998) afirmaram que filmes à base de proteína do soro de leite são parcialmente insolúveis em água devido a presença de ligações dissulfídicas intermoleculares, tornando-os resistentes à solubilização em tampões aquosos. A presença deste tipo de ligação na matriz pode ter “aprisionado” o óleo de orégano, o que provocou uma redução na solubilidade em água, sendo acentuada com o aumento da concentração do óleo e pela natureza hidrofóbica do componente. A solubilidade da proteína em água parece estar relacionada com a hidrofiliabilidade e a estrutura da matriz proteica resultante. A incorporação de um composto hidrofóbico na formulação de filmes protéicos reduz a capacidade da matriz formadora de filme para ligar-se com moléculas de água (McHUGH e KROCHTA, 1994). Segundo Bertan (2003), a solubilidade dos filmes em água está diretamente relacionada aos seus componentes, ou seja, com a hidrofiliabilidade/hidrofobicidade e estrutura.

Resultados semelhantes foram encontrados por Ferreira (2006) ao desenvolver filmes à base de gelatina em diferentes valores de pH adicionados de ceras de carnaúba e de cana-de-açúcar. O autor observou baixos valores de solubilidade em água nos filmes adicionados de ceras em pH básico (8,5).

Meira et al (2012) elaboraram filmes à base de amido modificado por reticulação, acetilação e com adição de lipídeo e celulose bacteriana. O autor

verificou que a solubilidade em água foi de 31,68% para os filmes de amido puro. Para os filmes com concentração de 5% e 10% de ácido esteárico foram encontrados valores mínimos de 13,48% e 22,84%, respectivamente.

5.1.5 Resistência máxima à tração (RMT)

Os valores de resistência máxima à tração são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Resistência máxima à tração (RMT) dos filmes de proteína de soro do leite.

Tratamentos	RMT (MPa)
Controle	66 ± 5 ^c
0,5% OEO ¹	96,3 ± 3 ^b
1,0% OEO	108,7 ± 7 ^a
1,5% OEO	91,5 ± 8 ^b

¹OEO: óleo essencial de orégano; ^{a,b} Médias com letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente entre si ($p < 0,05$).

O filme controle apresentou menor resistência quando comparado com todos os outros. O óleo de orégano melhorou a resistência do filme. Entre as diferentes concentrações de óleo, o filme com adição de 1% de óleo essencial teve resistência significativamente maior do que os demais.

Esses parâmetros fornecem informações sobre as forças intermoleculares envolvidas na estabilização da matriz polimérica e sobre a energia necessária para que o filme se rompa (ROBERTSON, 1993). A resistência à tração é a máxima tensão suportada pelo filme até o momento de sua ruptura enquanto o módulo de Young ou módulo de elasticidade é a medida da rigidez do material (MACLEOD et al., 1997).

As proteínas que constituem o soro do leite sofrem a desnaturação a uma temperatura próxima de 70°C (PÉREZ-GAGO e KROCHTA, 2002). Durante a elaboração da solução formadora de filmes, a mesma passou por um tratamento térmico de 90°C/30min, que provocou desnaturação da proteína contribuindo para formação da matriz do filme. Segundo Ferreira (2008) o tratamento térmico provoca alterações da estrutura tridimensional da proteína, causando a exposição dos grupos hidrofóbicos e SH que estavam no interior da molécula, efeito que promove o estabelecimento de ligações S-S e interações hidrofóbicas durante a secagem, o

que contribui para a formação do filme com propriedades mecânicas aceitáveis.

Desta forma, o aquecimento utilizado para elaboração dos filmes nesse estudo provocou desnaturação da proteína, exposição dos grupos sulfidrilas, resultando em um aumento de ligações covalentes S-S nos filmes, caracterizando formação de filmes mais estáveis e com capacidade de estender. O mesmo foi discutido por Fairley et al. (1996), onde grupos SH livres se associaram na capacidade de estender de filmes a base de isolado proteico de soro de leite.

Yoshida (2002) observou que a resistência à tração foi maior para filmes com altas concentrações de proteína do soro do leite (5,5% para 7,5%) gerando elevação na tensão na ruptura da ordem de 0,4493 Mpa, que relaciona com o aumento do número de ligações covalentes S-S na matriz filmogênica, em virtude da maior quantidade de grupos sulfidrílicos na superfície proteica.

Como já discutido anteriormente a incorporação de óleo de orégano na solução formadora de filme provocou: (i) desestabilização da matriz resultando em aumento da PVA e (ii) as ligações formadas com a desnaturação da proteína fez com que o óleo ficasse aprisionado provocando aumento da hidrofobicidade da matriz. O “espaçamento” provocado pelo óleo pode ter possibilitado maior número de ligações dos grupos laterais da cadeia de proteína, resultando em maiores interações e conseqüentemente a maior resistência a tração observada. As propriedades mecânicas estão diretamente relacionadas com a natureza do material filmogênico utilizado e com a coesão da estrutura da matriz polimérica, que está relacionada com a distribuição e concentração inter e intramoleculares na estrutura filmogênica entre as cadeias de proteínas (CUQ; GONTARD; GUILBERT, 1998).

O aumento da concentração de óleo de 1% para 1,5% resultou em uma diminuição na resistência de 108,7 MPa para 91,5 MPa, que pode ter sido resultante do efeito plastificante provocado pelo “excesso” de óleo ou pelo efeito lubrificante da matriz. Pelissari et al. (2009) também observaram a redução da RMT em filmes de amido e quitosana adicionados de 0,1%, 0,5% e 1,0% de óleo essencial de orégano e atribuíram estes resultados à capacidade plastificante do óleo de orégano. Alguns lipídeos (acetoglicerídeos, ácidos graxos, monoglicerídeos, fosfolipídeos) são usados para aumentar a flexibilidade dos filmes poliméricos. Eles são considerados plastificantes, por enfraquecerem as forças intermoleculares entre as cadeias poliméricas adjacentes, desta forma influenciando as propriedades mecânicas dos filmes (CALLEGARIN et al., 1997). Gontard et al. (1994) observaram

em filmes de glúten que a influência dos lipídeos depende das características destes e da capacidade de interagir com a matriz estrutural de proteína. Observaram também que a resistência à tração diminuiu com o aumento da concentração de lipídeos.

Resultados semelhantes foram observados por Sanchez-Gonzales (2010), que trabalhou com filmes a base de proteína de soja ou de glúten, com a incorporação de 1% de óleo essencial de alecrim (p/p). Os resultados mostraram uma redução da RMT de 75 MPa para 72 MPa e a incorporação de 2% do óleo reduziu a RMT para 54 MPa.

5.2 TESTE DE DIFUSÃO EM HALO

Os resultados do teste de difusão em halo são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Perfil microbiológico da eficiência dos filmes ativos pelo teste de difusão em halo para *Penicillium commune*.

Controle	UFC/ml	Diâmetro da zona de inibição (cm)
Controle	$5,13 \times 10^5$ ^a	$0,00 \pm 0$ ^b
0,5% OEO	$3,17 \times 10^5$ ^a	$0,07 \pm 0,1$ ^b
1,0% OEO	$3,14 \times 10^5$ ^a	$1,27 \pm 0,8$ ^a
1,5% OEO	$1,98 \times 10^5$ ^a	$1,65 \pm 0,5$ ^a

¹OEO: óleo essencial de orégano; ^{a,b}Médias com letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente entre si ($p < 0,05$).

Figura 2 - Colônias de *Penicillium commune*.

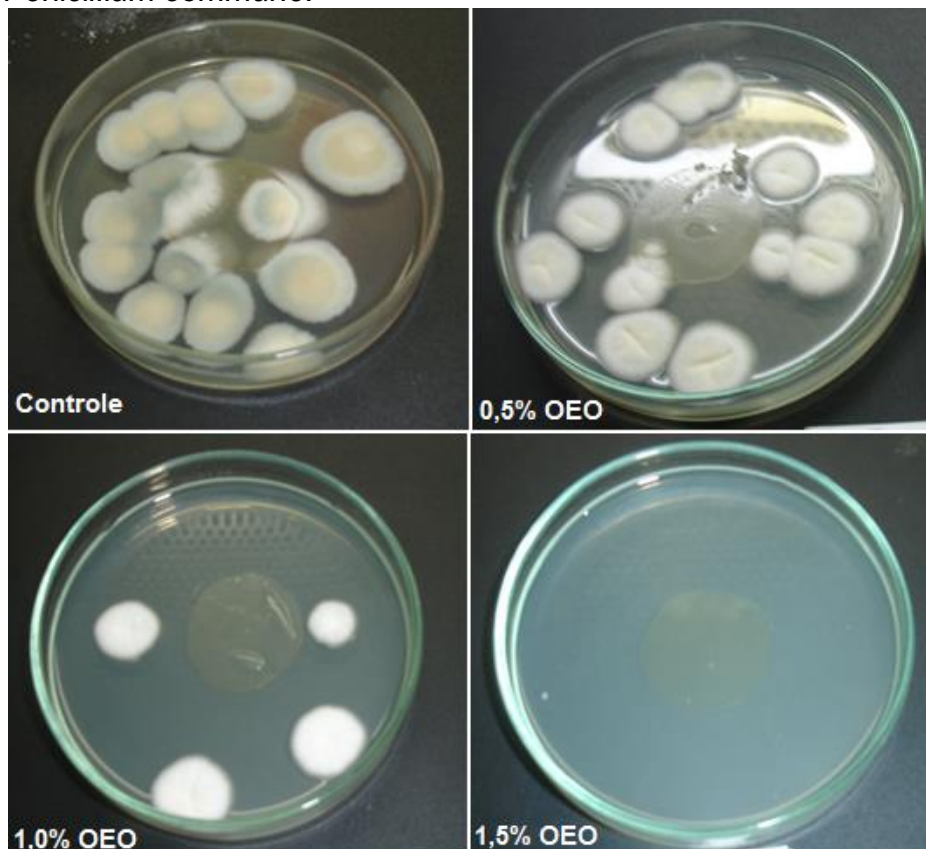


A concentração média da suspensão de *Penicillium commune* foi de $5,5 \times 10^5$ UFC/mL. A adição de óleo essencial de orégano não causou diferença

significativa no número de unidades formadoras de colônia e foi para todos os tratamentos da ordem de 10^5 UFC/mL.

Devido à sua heterogeneidade, o halo de inibição foi medido como a menor distância entre o filme e a unidade formadora de colônia mais próxima. O halo variou de 0 a 1,65 cm. Foi observado um aumento significativo do diâmetro do halo com o aumento da concentração de óleo de orégano (Figura 3). Os filmes adicionados de 1,0% e 1,5% de óleo de orégano apresentaram halos significativamente maiores que os filmes controle e com 0,5% de óleo. Não foi observada diferença significativa entre o diâmetro dos halos dos filmes com 1,0 e 1,5% de óleo de orégano.

Figura 3 - Teste de difusão em halo para os filmes de proteína de soro do leite adicionados de diferentes concentrações de óleo essencial de oréganos (OEO) frente ao *Penicillium commune*.



Oussallah et al. (2004) mostraram que 1% de óleo essencial de orégano incorporado em um filme de caseinato de cálcio e isolado proteico de soro e carboximetil celulose apresentou efeito inibitório contra *E. coli* O157:H7 e *Pseudomonas* spp. na superfície de pedaços de bife de carne bovina. Este estudo

sugere que 2% de óleo essencial de orégano em filmes de WPI foi a concentração mínima com efeito inibitório contra *S. aureus*, *S. enteritidis*, *L. monocytogenes*, *L. plantarum* e *E. coli* O157: H7.

Seydim e Sarikus (2006) realizaram teste do halo para filmes comestíveis de isolado proteico de soro contendo óleo essencial de orégano sobre diferentes microrganismos. Ao contrário dos resultados observados no presente estudo, os autores não observaram efeito antimicrobiano nos filmes com 1% de óleo de orégano para os micro-organismos testados. A mínima concentração requerida para inibição foi de 2%. A maior zona de inibição foi observada em concentração de 4% contra *S. aureus*, *Salmonella enteritidis* e *L. monocytogenes*.

Trabalhando com filmes de amido e quitosana adicionados de óleo essencial de orégano em diferentes concentrações (0%, 0,1%, 0,5% e 1,0%), Pelissari et al. (2009) observaram o aumento das zonas de inibição com o aumento das concentrações de óleo para diferentes micro-organismos. Os maiores halos de inibição foram observados para bactérias Gram-positivas (*B. cereus* e *S. aureus*) quando comparados com bactérias Gram-negativas (*S. enteritidis* e *E. coli*).

6 CONCLUSÃO

Os resultados permitem concluir que o isolado proteico de soro é uma boa matriz para produção de filmes flexíveis biodegradáveis e a adição de óleo essencial de orégano, mesmo em pequenas quantidades de maneira geral afetou positivamente as características dos filmes. A permeabilidade ao vapor de água aumentou com o aumento da concentração de óleo, enquanto a solubilidade dos filmes diminuiu. A adição do óleo de orégano também permitiu a produção de filmes mais flexíveis e com maior resistência à ruptura, especialmente na concentração de 1,0%. Além disso, os filmes ativos apresentaram atividade antimicrobiana contra o *Penicillium commune* nas concentrações de 1,0% e 1,5%. Desta forma, os filmes a base de isolado de proteína de soro de leite, incorporados com óleo essencial de orégano tem potencial de aplicação como embalagens ativas na área de alimentos, podendo prolongar da vida de prateleira dos produtos.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANKER, M.; STADING, M.; HERMANSSON, A. Aging of whey protein films and the effect on mechanical and barrier properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 2, p. 989-995, 2001.

APPENDINI, P.; HOTCHKISS, J. H., Review of antimicrobial food packaging. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, V. 3, p. 113-126, 2002.

ARVAMITTOYANNIS, I.; NAKAYAMA, A.; AIBA, S., Edible films made from hidroxypropyl starch and gelatin and plasticized by polyols and water. **Carbohydrate Polymers**, V. 36, p. 105-119, 1998.

ARVANITOYANNIS, I. S.; PSOMIADOU, E.; NAKAYAMA, A. Edible films made from sodium caseinate, starches, sugars or glycerol. Part 1. **Carbohydrate Polymer**, v. 31, n. 4, p. 179-192, 1996.

ASTM. Standard test methods of water vapor transmission of materials. **American Society for Testing and Materials**, Philadelphia, E 96-95, 1995.

ASTM. Tensile properties of thin plastic sheeting. **Annual Book of ASTM Standards**, American Society for Testing and Materials, Philadelphia, D 882-10, 2010.

BATISTA, L. R.; CHALFOUN, S. M.; PRADO, G.; SCHWAN, R. F.; WHEALS, A. E. Toxigenic fungi associated with processed (green) coffee beans (*Coffea arabica* L.). **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 85, n. 3, p. 293-300, Aug. 2003.

BAYDAR, H.; SAĞDIÇ, O.; ÖZKAN, G.; KARADOĞAN, T. **Antibacterial activity and composition of essential oils from *Origanum*, *Thymbra* and *Satureja* species with commercial importance in Turkey**. Food Control, v. 15, n. 3, p. 169-172, 2004.

BERTAN, L. C. **Desenvolvimento e caracterização de filmes simples e compostos a base de gelatina, ácidos graxos e breu branco**. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, 2003.

BERTAN, L. C.; TANADA-PALMU, P. S.; SIANI, A. C.; GROSSO, C. R. F. **Effect of fatty acids and “Brazilian elemi” on composite films base don gelatin**. Food Hydrocolloids, Tongxiang City, v. 19, n. 1, p. 73-82, 2005.

BOTRE, D. A.; SOARES, N. de F. F.; ESPITIA, P. J. P.; SOUSA, S.; RENHE, I. R. T. Avaliação de filme incorporado com óleo essencial de orégano para conservação de pizza pronta. **Revista Ceres**, v. 57, n.3, p. 283-291, 2010.

BOTREL, D.A.; SOARES, N.F.F.; GERALDINE, R. M.; PEREIRA, R.M.; FONTES, E.A.F., **Qualidade de alho (*allium sativum*) minimamente processado envolvido com revestimento comestível antimicrobiano.** Cien. e Tecn de Alimento Vol 27, nº 1 Campinas jan /mar 2007

BRASIL (2007) Resolução nº 2, de 15 de janeiro de 2007. Aprova o Regulamento Técnico sobre Aditivos Aromatizantes, que consta como anexo da presente Resolução. **Diário Oficial da União; Poder Executivo**, de 17 de janeiro de 2007. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/e-legis/>>. Acessado em 20/02/2013

BRISSON, D; VOHL, MC; ST-PIERRE, J; HUDSON, TJ; GAUDET, D. **Glycerol: a neglected variable in metabolic process?** In: BioEssays v.23, pp. 534-542, 2001

BUSATTA, C. **Caracterização química e atividade antimicrobiana in vitro e em alimentos dos extratos de orégano e manjerona.** 2006. 110p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI, Erechim, 2006.

CALLEGARIN, F; GALLO, J-A Q; DEBEAUFORT, F.; VOILLEY, A Lipids and Biopackaging. **Journal of American Oil Chemistry Society**, Champaign, v.74, n.10, p.1183-1192, 1997.

CHEN, H. **Formation and Properties of Casein Film and Coating.** In: Protein based 420 edible film and coating, Gennadios, A. New Jersey: CRC Press, 181-212, 2002.

CISNEROS-ZEVALLOS, L.; KROCHTA, J.M. Whey protein coatings for fresh fruits and relative humidity effects. **Journal of Food Science**, v.68, p.176-181, 2003.

COMA, V. Bioactive packaging technologies for extended shelf-life of meat based products **Meat Science**, Barking, v.78 n.º 1-2, p. 90-103, 2008

CRAVEIRO, A. A.; FERNANDES, A. G.; ANDRADE, C. H. S.; MATOS, F. J. A.; ALENCAR, J. W.; MACHADO, M. I. L. **Óleos essenciais de plantas do Nordeste.** Fortaleza: edições UFC, 1981. 210 p.

CUQ, B. GONTARD, N.; GUILBERT, S. Proteins as agricultural polymers for packaging production. **Cereal Chemistry**, St. Paul, v.75, n.1, p.1-9, 1998.

DEVLIEGHIERE, F.; VERMEIREN, L.; DEBEVERE, J.; New preservation technologies : Possibilities and limitation . **International Dairy Journal**, Barking, v.14, n.º4, p.273-285, 2004

DONHOWE, G.; FENNEMA, O. Edible films and coatings: characteristics, formation, definitions, and testing methods. In: KROCHTA, J.M.; BALDWIN, E.A.; NISPEROS-CARRIEDO, M.O. (Ed.). **Edible coatings and films to improve food quality.** Lancaster: Technomic Publ. Co., 1994. p.1-24.

DORMAN, H. J. D.; DEANS, S.G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, n. 2, p. 308-316, 2000.

FANG, Y.; TUNG, M.A.; BRITT, I.J.; YADA, S.; DALGLEISH, D.G. Tensile and barrier properties of edible films made from whey proteins. **Journal of Food Science**, v.67, p.188-193, 2002.

FAKHOURI, F. M.; GROSSO, C. Efeito de coberturas comestíveis na vida útil de goiabas in natura (*Psidium guajava* L.) mantidas sob refrigeração. **Brasilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 6, n. 2, p. 203-211, 2003.

FARLEY ,P.MONAHAN;F.J.GERMAN;B.B;KROCHTA J.M., **Mechanical properties and water vapor permeability of edible films from whey proteins isolate and N ethylmaleimidie or cysteine**. Journal of Agricultural and Food Chemystri, Washington,v. 44,n.12,pg 3789-3792,1996

FERNANDES, F. F and Freitas, E. P. S. (2006), Acaricidal Activity of an oleoresinous extract from *Copaifera reticulata* (Leguminosae: Caesalpinioideae) Against Larvae of the Southern Cattle Tick, *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). **Vet. Parasitol.**, 147, 150-154.

FERREIRA, A. H. **Efeito da adição de surfactantes e do ajuste de pH sobre filmes a base de gelatina, triacetina, ácidos graxos e ceras de carnaúba e de cana de açúcar**.2006. 184p. Tese (Doutorado em Alimentos e Nutrição) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

FERREIRA, C de O. **Desenvolvimento e caracterização de filmes à base de proteínas do soro do leite – potencial funcionalização com quitosanos**. 2008. 85p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Química) - Universidade de Aveiro, Portugal, 2008.

FERRI, P. H. “Química de produtos naturais: métodos gerais”, capítulo do livro **Plantas Medicinais: Arte e Ciência – Um Guia de Estudo Interdisciplinar**, organizado por Luiz Cláudio Di Stasi, p. 69-86, Ed. Unesp, p. 29-35, 1995.

FDA (2006) Food and Drug Administration. **Department Of Health And Human Services. Essential oils, oleoresins (solvent-free), and natural extractives (including distillates)** In.: Substances generally recognized as safe. Disponível em: <<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=582.20>> Acessado em:5 janeiro de 2013.

FOX, P.F; McSWEENEY, P.L.H. **Dairy Chemistry and Biochemistry**. Blackie Academic & Professional, 1998.

FRIEDMAN, M., P. R. HENIKA, and R. F. Mandrel[. 2002. Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, **J. Agric. Food Chem.** 52:6042-6048. 2002

GALIETTA, G.; DI GIOLA, L.; GUILBERT, S.; CUQ, B. **Mechanical and thermomechanical properties of films based on whey proteins as affected by plasticizer and crosslinking agents.** *Journal of Dairy Science*, v. 81, p. 3123-3130, 1998.

GENNADIOS, A.; McHUGH, T. H.; WELLER, C. L.; KROCHTA, J. M. Edible coatings and films based on proteins. In: KROCHTA, J. M.; BALDWIN, E. A.; NISPEROS-CARRIEDO, M. O. (Ed.). **Edible coatings and films to improve food quality.** Lancaster: Technomic Publ. Co., 1994. p. 201-277.

GONTARD, N.; DUCHEZ, C.; CUQ, J-L.; GUILBERT, S. Edible composite films of wheat and lipids: water vapour permeability and other physical properties. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v.29, p.39-50, 1994.

GONTARD, N.; DUCHEZ, C.; CUQ, J-L.; GUILBERT, S. Edible composite films of wheat and lipids: water vapor permeability and other physical properties. **International Journal of Food Science and Technology**, v.29, p.39-50, 1994.

GONTARD, N.; GUILBERT, S.; CUQ, J. L. Water and glycerol as plasticizers affect mechanical and water vapor barrier properties of an edible wheat gluten film. **Journal of Food Science**, Chicago, v.58, n.1, p.206-211, 1993.

GOUNGA, M. E., XU, S. Y. & WANG, Z. Whey protein isolate-based edible films as affected by protein concentration, glycerol ratio and pullulan addition in film formation. **Journal of Food Engineering**, 83, 521-530, 2007.

GUILBERT, S. Technology and application of edible protective films. In Mathlouthi, M. (Ed.), **Food packaging and preservation**, p. 371–394. London, UK: Elsevier Applied Science 1986

HERSHKO, V.; NUSSINOVITCH, A. Physical properties of alginate-coated onion (*Allium cepa*) skin. **Food Hydrocolloids**, v. 12, n. 2, p. 195-202, 1998.

KAMPER, S. L., FENNEMA, O. Water vapor permeability of an edible, fatty acid bilayer film. **Journal of Food Science**, Chicago, v.49, p.1482-1485, 1984b.

KAMPER, S. L., FENNEMA, O. Water vapor permeability of edible bilayer films. **Journal of Food Science**, Chicago, v.49, p.1478-1481, 1984a.

KESTER, J. J.; FENNEMA, O. R., Edible Films and Coatings: A Review. **Food Technology**, V. 40, n. 12, p. 47-59, 1986.

KHWALDIA, K., PEREZ, C., BANON, S., DESOBRY, S., & HARDY, J. Milk proteins for edible film and coatings. **Food Science Nutritional**, 44, 239-251, 2004.

KIM, S. J.; USTUNOL, Z. Sensory attributes of whey protein isolate and candellila wax emulsion edible films. **Journal of Food Science**, v. 66, n. 6, p. 909-911, 2001.

KING, A. D.; BOLIN, H. R. Physiological and microbiological storage stability of minimally processed fruits and vegetables. **Food Technology**, v. 43, n. 2, p. 132-139, 1989.

KROCHTA, J. M., DE MULDER-JOHNSTON, C. Edible and biodegradable polymer films: challenges and opportunities. **Food Technology**, v. 51, n. 2, p. 61-74, 1997.

KROCHTA, J. M.; BALDWIN, E. A.; NISPEROS-CARRIEDO, M.; **Edible coatings and films to improve food quality**. V. 1, Lancaster: CRC Press, 1994.

KROTCHA, J. M. Proteins as raw materials for films and coatings: definitions, current status, and opportunities. In: GENNADIOS, A. **Protein-based films and coatings**. Boca Raton: CRC Press, 2002. cap.1, p.1-41

LABUZA T. P.; CONTRERAS M. R. Prediction of moisture protection requirements for foods. **Cereal Foods World**, v.26, n.7, p.335, 1981.

LAWTON, J. W., Effect of starch type on the properties of starch containing films. **Carbohydrate Polymers**, V. 29, p. 203-208, 1996.

LEISTNER, L. Hurdle effect and energy saving. In: Downey, W.K. (Eds.) **Food Quality and Nutrition**. London, Applied Science Publishers. p.553.1978.

LEUSCHNER, R.G.K.; ZAMPARINI, J. Effects of spices on growth and survival of Escherichia coli 0157 and Salmonella enterica serovar enteridis in broth model systems and mayonnaise. **Food control**, v.13,nº 6-7,p.399-404,2002

LI, P.; BARTH, M.M. Impact of edible coatings on nutritional and physiological changes in lightly-processed carrots. **Postharvest Biology and Technology**, v. 14, n. 1, p. 51-60, 1998.

LIU, J., Ben-Shahar, T. R., Riemer, D., Treinin, M., Spann, P., Weber, K., Fire, A., & Gruenbaum, Y. (2000). **Essential roles for Caenorhabditis elegans lamin gene in nuclear organization, cell cycle progression, and spatial organization of nuclear pore complexes**. Mol Biol Cell, 11, 3937-47.

LÓPES, FD; REVILLA, JLG; MUNILLA, MH. *Glicerol*. In: **Manual dos Derivados da Cana-de-Açúcar: diversificação, matérias-primas, derivados do bagaço do melaço, outros derivados, resíduos, energia**. Brasília: ABIPTI, cap. 5.4, pp. 393-397,1999.

LUND, F.; FILTENBORG, O.; FRISVAD, J. C. Associated mycoflora of cheese. **Food Microbiology**, London, v. 12, n. 2, p. 173-180, Apr. 1995.

MacLeod, G. C. 1990, Ph.D. thesis, Queen's Univ., Kingston, Canada **First citation in article** AD. 1991, MNRAS, 252, 36P First citation in article

MALI, S., GROSSMANN, M. V. E., GARCÍA, M. A., MARTINO, M. M.; ZARITZKY, N. E. Barrier, mechanical and optical properties of plasticized yam starch films. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v.56, p.129-135, 2004.

MALI, S.; GROSSMANN, M. V. E.; GARCÍA, M. A.; MARTINO, M. N.; ZARITZKY, N. E., Microstructural characterization of yam starch films. **Carbohydrate Polymers**, V. 50, p. 379-386, 2002.

MANOHAR, V., et. al. Antifungal activities of origanum oil against *Candida albicans*. **Molecular and Cellular Biochemistry**, vol. 228, p. 111-117, 2001.

MARTIN-POLO, M.; VOILLEY, A.; BLOND, G.; COLAS, B.; MESNIER, M.; FLOQUET, N. Hydrophobic Films and their efficiency against moisture transfer. 2. Influence of the physical state. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.40, n.3, p. 413-418, 1992.

MATÉ, J. I.; KROCHTA, J. M. Oxygen uptake model for uncoated and coated peanuts. **Journal of Food Engineering**, v. 35, n. 3, p. 299-312, 1998.

McHUGH, T. H. KROCHTA, J. M. Milk-protein-based edible films and coating. **Food Technology**. Chicago, v.48, n.1, p.97-103, 1994

McHUGH, T. H., AUJARD, J. F & KROCHTA, J. M. **Plasticized whey protein edible films: Water vapor permeability properties**. *Journal of Food Science*, 59: 416-20, 1994

McHUGH, T. H.; KROCHTA, J. M. Dispersed phase particle size effects on water vapor permeability of whey protein-beeswax edible emulsion films **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 18, n. 3, p. 173-188, 1994.

McHUGH, T. H.; SENESI, E. Apple wraps: a novel method to improve the quality and extend the shelf life of fresh-cut apples. **Journal of Food Science**, v. 65, n. 3, p. 480-485, 2000.

MEIRA, V. C. R. S. **Preparação e caracterização de filmes de amido modificado por reticulação, acetilação e com adição de lipídio e celulose bacteriana**. 2012. 199p. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa, Florianópolis, 2012.

MILLER, K. S. and J. M. Krochta. 1997. Oxygen and aroma barrier properties of edible films: A review. **Trends in Food Science & Tech.** 8(7):228-237. Miller, K. S. 1997

MILOS, M.; MASTELIC, J.; JERKOVIC, I. Chemical composition and antioxidant effect of glycosidically bound volatile compounds from oregano (*Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum*). **Food Chemistry**, v. 71, n. 1, p. 79-83, 2000.

MIN, S.; KROCHTA, J. M. Ascorbic Acid-Containing Whey Protein Film Coatings for Control of oxidation. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 55, n. 8, p. 2964-2969, 2008.

MORR, C. V.; HA, Y. W. Whey protein concentrates and isolates: processing and functional properties. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 33, n. 6, p. 431-476, 1993.

MORRISON, LR. *Glycerol*. In: **Encyclopedia of Chemical Technology**. New York: Wiley, pp. 921-932, 1994

MURATORE, G. et al. The influence of using biodegradable packaging .films on the quality decay kinetic of plum tomato *Pomodorino Datterino*. **Journal of Food Engineering**, v. 67, n. 4, p. 393-399, 2005.

OJAG,S.M.,REZAEL,M.,RAZAVI,S.H.,HOSSEINI,S.M,H Development and evaluation of a novel biodegradablefilme madefrom chitosan e cinnamon essential oil with low affinity toward water.**Food Chemistry**, London, v.122, n.1,p. 161-166, 2010.

OUSSALLAH, M.; CAILLET, S.; SALMIERI, S.; SAUCIER, L.; LACROIX, M. Antimicrobial and antioxidant effects of milk protein based film containing essential oils for the preservation of whole beef muscle. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, 52:5598-5605, 2004.

PARK, H. J. Development of advanced edible coatings for fruits. **Trends in Food Science and Technology**, v. 10, p. 254-260, 1999.

PELISSARI, F. M.; GROSSMANN, M. V. E.; YAMASHITA, F.; PINEDA, E. A. G. **Antimicrobial, mechanical, and barrier properties of cassava starch–chitosan films incorporated with oregano essential oil**. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 57, n. 16, p. 7499-7504, 2009.

PEREIRA, M. C.; VILELA, G. R. ; COSTA, L. M. A. S.; SILVA, R. F.; FERNANDES, A. F. ; FONSECA, E. V.N. ; PICCOLI, R. H.F. **Inibição do desenvolvimento fúngico através da utilização de óleos essenciais de condimentos** . *Ciência e Agrotecnologia*, v. 30, p. 731-738, 2006

PEREZ-GAGO, M. B.; KROCHTA, J. M. **Formation and properties of whey protein films and coatings**. In **Protein-based films and coatings**; Gennadios, A., Ed.; CRC Press: Boca Raton, FL, 2002; pp 159-180.

PÉREZ-GAGO; KROCHTA, J.M. Denaturation time and temperature effects on solubility, tensile properties, and oxygen permeability of whey protein edible films. **Journal of Food Science**, Chicago, v.66, n.5, p.705-710, 2001.

PITT, J. I. Toxigenic fungi: which are important. **Medical Mycology**, Oxford, v. 38, p. 17-22, 2000. Supplement.

QUINTAVALLA & VICINI L (2002) Antimicrobial food in meat industry. **Meat Science**, 62:373-380.

RAMOS, M.F.S (2006). Desenvolvimento de microcapsules contendo fração volátil de óleo de copaíba por spray-drying: estudo de estabilidade e avaliação farmacológica. Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, SP Resolução nº 386 de 5 de Agosto de 1999. Disponível em: www.anvisa.gov.br/alimentos/aditivos_alimentares.htm. Acesso em 20 de julho de 2006

RAHMAN, M., BRAZEL, C.S. The plasticizer market: an assessment of traditional plasticizers and research trends to meet new challenges. **Progress in Polymer Science**, v. 29, p. 1223-1248, 2004

RHAYOUR, K., BOUCHIKHI, T., TANTAOUIELARAKI, A., SENDIDE, K., REMMAL, A., The mechanism of bactericidal action of oregano and clove essential oils and of their phenolic major components on *Escherchia coli* and *Bacillus subtilis*. **Journal of Essential Oil Research**, [S.l.], v. 15, n. 5, p. 356-362, 2003.

ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. **Farmacognosia e farmacobiotecnologia**. São Paulo: Premier, 1997. 327p.

Robertson, G., L. (1993) **Food Packaging: Principles and Practice**. Marcel Dekker. New York.

Robertson, G. (2006). **Food Packaging: principles and practice**. CRC Press. Cap. 1. pag. 3.

SAHIN, F.; GÜLLÜCE, M.; DAFERERA, D.; SÖKMEN, A.; SÖKMEN, M.; POLISSIOU, M.; AGAR, G.; ÖZER, H. Biological activities of the essential oil and methanol extract of *Origanum vulgare* ssp. *Vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey. **Food Control**, v. 15, n. 7, p. 549-557, 2004.

SAMSON, R. A.; HOEKSTRA, E. S.; FRISVAD, J. C.; FILTENBORG, O. **Introduction to food-borne fungi**. 4. ed Centraalbureau: Voor Schimmelcultures Baarn Delft, 2000.

SANTOS, R. I. Metabolismo Básico e Origem dos Metabólitos Secundários. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre, RS: Ed. Da UFSC, 2004. 1102 p.

SCHOU, M., LONGARES, A., MONTESINOS-HERRERO, C., MONAHAN, F. J., O'RIORDAN, D., O'SULLIVAN, M. Properties of edible sodium caseinate film and their application as food wrapping. **LWT- food science and technology**, 38, 605-610, 2004.

SEVERO, L.M.B. **Desenvolvimento de uma Bebida Láctea a Base de Soro de Leite Fermentado**. 1995. 67 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos), Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

SEYDIM, A. C.; SARIKUS, G. Antimicrobial activity of whey protein based edible films incorporated with oregano, rosemary and garlic essential oils. **Food Research International**, Barking, v.39, p.639-644, 2006.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre, RS: Ed. Da UFSC, 2004. 1102 p.

SIVROPOULOU, A.; PAPANIKOLAOU, E.; NIKOLAOU, C.; KOKKINI, S.; LANARAS, T.; ARSENAKIS, M. Antimicrobial and cytotoxic activities of origanum essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p. 1202-1205, 1996.

SOARES, N. F. F. **Bitterness Reduction in Citrus Juice Through Naringinase Immobilized into Polymer Film**. Ph.D. New York, 1998, 130 p. Dissertation, Cornell University.

SOARES, N. F. F.; SILVA, W. A.; PIRES, A. C. S.; CAMILOTO, G. P.; SILVA, P. S. novos desenvolvimentos e aplicações em embalagens de alimentos. **Revista Ceres**, Viçosa, v.56 n°4 p.370-378, 2009

SOUZA, E. L.; STAMFORD, T. L. M.; LIMA, E. O. Sensitivity of Spoiling and Pathogen food-related bacteria to *Origanum vulgare* L. (*Lamiaceae*) essential oil. **Brazilian Journal of Microbiology**, 37:527-532, 2006.

TAJKARIMI, M. M.; IBRAHIM, S. A.; CLIVER, D. O.; Antimicrobial herb and spice compounds in food. **Food control**, Guildford, v.21, n°9 p.1199-1218, 2010.

TALENS, P.; KROCHTA, J. M. Plasticizing effects of beeswax and carnauba wax on tensile and water vapor permeability properties of whey protein films. **Journal of Food Science**, v.70, p.239-243, 2005.

TANIWAKI, M. H.; SILVA, N. **Fungos em alimentos – ocorrência e detecção**. Campinas: Núcleo de Microbiologia/ITAL, 2001. 82 p.

TEUBER, M. Spread of antibiotic resistance with food borne pathogens. **Cellular and Molecular Life Science**, v.56, n 4, p. 755-763, 1999.

THARANATHAN, R. N. Biodegradable films and composite coatings: past, present and future. **Trends in Food Science and Technology**, v. 14, n. 3, p. 71-78, 2003.

TORRES, D. **Gelificação térmica de hidrolisados enzimáticos de proteínas do soro de leite bovino: comportamento de sistemas aquosos mistos péptidos polissacarídeos**. 2005. 99 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Departamento de Engenharia Biológica da Universidade do Minho, Braga, 2005.

TORRES, J. A. Edible films and coatings from proteins. In: HETTIARACHCHY, N. S. e ZIEGLER, G. R. (eds). **Protein Functionality in Food Systems**, New York: Marcel Dekker, Inc., p. 467-507, 1994.

VERMEIREN, L, J. et al. Development in the active packaging of foods. **Trends in Food Science e Technology**, v. 10, p. 77-86, 1999.

VILLADIEGO, A. M. D.; SOARES, N. F. F.; ANDRADE, N. J.; PUSCHMANN, R.; MINIM, V. P. R.; CRUZ, R., Filmes e revestimentos comestíveis na conservação de produtos alimentícios. **Revista Ceres**, Viçosa, V. 52, n. 300, p. 221-244, 2005.

WHO. **Food safety and foodborne illness**. World Health Organization Fact sheet. Geneva, 2002.

WONG, D. W. S; GASTINEAU, F. A; GREGORSKI, S. S.; TILLIN, S. J; PAVLATH, A E. Chitosan-lipid films: microstructure and surface energy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Chicago, v.40, p.540-544, 1992.

WORRELL, D. B., CARRINGTON, C. M. S., HUBER, D. J. The use of low temperature and coating to maintain storage quality of breadfruit, *Artocarpus altilis* (Parks) Fosb. **Postharvest Biology and Technology**, v. 25, n. 1, p. 33-40, 2002.

YOSHIDA, C. M. P. **Aplicação de concentrado protéico de soro de leite bovino na elaboração de filmes comestíveis**. 2002. 246 f. Tese (Doutorado) – Departamento de alimentos e nutrição, Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de alimentos, São Paulo, 2002.

YOSHIDA, C. M. P.; ANTUNES, A. J. Aplicação de filmes proteicos à base de soro de leite. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n.2, p. 420-430, 2009.

ZINAVIADOU,K.G.;KOUTISOUMANIS,K.P;;BILIADERIS C.G Physical chemical properties of whey proteins isolates films containing oregano oil and their antimicrobial action against spoilage flora of fresh beef. **Meat Science**, Barking,v.82,n.3, p.338-345,2009.

ZIVANOVIC.; S.; CHI, S.; DRAUGHON, A. F. Antimicrobial activity of chitosan films enriched with essential oils. **Journal of Food Science**, 70, M45–M51, 2005.